

11 Rec'd PCT/PTO

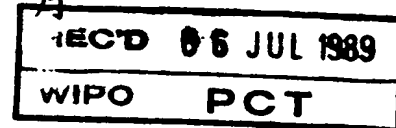
13 OCT 1989

PCT/JP89/00337

30.03.89

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 1988年5月18日

出 願 番 号
Application Number: 昭和63年特許願第121002号

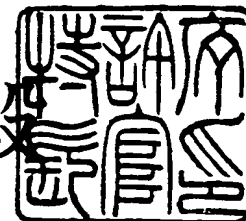
出 願 人
Applicant(s): 松下電器産業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1989年6月9日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

吉田文毅



出証平 1-95399

(14, 000 円)

63-121002

特 許 願 (2)

昭和 63 年 5 月 18 日

特 許 庁 長 官 殿

1 発 明 の 名 称

バ イ オ セ ン サ

2 請 求 項 の 数 6

3 発 明 者

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
 松下電器産業株式会社内
 氏 名 南 海 史 朗
 (ほか3名)

4 特 許 出 願 人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
 名 称 (582) 松下電器産業株式会社
 代 表 者 谷 井 昭 雄

5 代 理 人 〒 5 7 1

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
 松下電器産業株式会社内
 氏 名 (5971) 弁理士 中 尾 敏 男
 (ほか 1 名)

〔連絡先 電話(東京)437-1121 東京法務分室〕

6 添付書類の目録

(1)	明 細 書	1	通
(2)	図 面	1	通
(3)	委 任 状	1	通
(4)	願 書 副 本	1	通

7 前記以外の発明者および代理人

(1) 発明者

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
松下電器産業株式会社内
氏 名 河 梨 真 理 子

住 所 同 所

氏 名 藤 田 真 由 美

住 所 同 所

氏 名 飯 島 効 志

(2) 代理人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
松下電器産業株式会社内
氏 名 (6152) 弁理士 栗 野 重 孝

明 細 書

1、 発明の名称

バイオセンサ

2、 特許請求の範囲

(1) 電極系と反応層を有する基板上に前記反応層を含む空間部を形成し、前記空間部に被検液を導入する導入口と、前記空間部の気体を前記被検液の流入によって排出する排出口を設けてなり、前記電極系は少なくとも測定極と対極を備え、前記反応層には酵素を担持してなり、前記酵素と前記被検液の反応に際しての物質濃度変化を前記電極系で検知し、前記被検液中の基質濃度を測定するバイオセンサ。

(2) 電極系が複数組の電極系からなり、前記複数組の電極系に各々対応した反応層と、共通の空間部を有してなる請求項1記載のバイオセンサ。

(3) 電極系が複数組の電極系からなり、前記複数組の電極系に対応した反応層と空間部を各々有してなる請求項1記載のバイオセンサ。

(4) 反応層が、酵素と親水性高分子からなる請

求項 1、 2 または 3 記載のバイオセンサ。

(5) 反応層が、酵素と親水性高分子と電子受容体からなる請求項 1、 2 または 3 記載のバイオセンサ。

(6) 空間部を構成する部材の表面が親水性を有してなる請求項 1、 2 または 3 記載のバイオセンサ。

3、 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に定量することのできるバイオセンサに関する。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なうことなく簡易に定量し得る方式として、特開昭 61-294351 号公報に記載のバイオセンサを提案した(第 10 図)。このバイオセンサは、絶縁性の基板 51 上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系 52 (52'), 53 (53'),

54 (54') を形成し、絶縁層 55 を設けた後、電極系の上を酸化還元酵素と電子受容体を担持した多孔体 57 で覆い保持枠 56 とカバー 58 で全体を一体化したものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、多孔体に担持されている酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、この還元された電子受容を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

発明が解決しようとする課題

このような従来の構成では、電極系を含む基板面の濡れが必ずしも一様とならないため、多孔体と基板との間に気泡が残り、応答電流に影響を与えたり反応速度が低下する場合があった。また、周囲の湿度が低いときには測定中に試料液の水分が蒸発し、応答の変動がみうけられた。

課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するため、電極系と反応層を有する基板上に該反応層を含む空間部を形

成し、前記空間部に被検液を導入する導入口と、前記空間部の気体を前記被検液の流入によって排出する排出口設けたものである。

作用

本発明によれば、ごく僅かの被検液量で極めて容易に、かつ精度よく基質濃度を測定することのできるディスポーザブルタイプのバイオセンサを構成することができる。

実施例

以下、本発明を実施例により説明する。

(実施例 1)

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。

第 1 図は本発明のバイオセンサの一実施例として作製したグルコースセンサの分解斜視図であり、第 2 図はその外観図、また第 3 図は、第 2 図に示すバイオセンサを長手方向に中央部で切断した場合の断面図である。なお、第 1 図には、第 3 図に示す反応層 14 は示されていない。

以下に、センサの作製方法について説明する。

ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板 1 に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード 2, 3 (3') を形成する。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、測定極 4、対極 5 (5') からなる電極系を形成する。さらに、電極系を部分的に覆い、電極の露出部分の面積を一定とし、かつリードの不要部を覆うように絶縁性ペーストを印刷し、加熱処理をして絶縁層 6 を形成する。

次に、電極系 4、5 (5') の露出部分を研磨後、空气中で 100℃ にて 4 時間熱処理を施した。このようにして電極部分を構成した後、親水性高分子として、カルボキシメチルセルローズ (以下 CMC と略す) の 0.5 wt% 水溶液を電極上へ展開、乾燥し CMC 層を形成する。次に、この CMC 層を覆うように、酵素としてグルコースオキシダーゼ (GOD) をリン酸緩衝液に溶解したものを展開し、乾燥させ、CMC-GOD 層からなる反応層 14 を形成した。この場合、CMC と GO

Dは部分的に混合された状態で厚さ数ミクロンの薄膜状となっている。

次に、この基板1と樹脂板からなるスペーサ7とカバー9の3つの部材について、第1図に示す様に、各部材間が破線で示す位置関係になるように接着し、第2図の外観図に示すように一体化した。ここで、スペーサは約300 μ mの厚みを有し、その中央部を幅2mm、長さ7mmのU字型に切りとった形状をしており、切りとられた部分の端部は一体化したときに試料液の導入口10となり、中央部は空間部8を形成する。また、カバー9は直径2mmの穴を有しており、一体化したときに排出口11となる。

上記のように構成したグルコースセンサの先端の導入口を試料液であるグルコース標準液(200mg/dl)に接触させると、試料液は導入口10より内部へ導かれる。このとき空間部8内の空気は排出口11から速やかに排出され、同時に空間部は排出口近傍まで試料液で満たされた。このように試料液は電極面上を速やかに拡がり空間

部を満たすため、気泡の残留は認められなかった。

これは、導入口と排出口を設けることにより試料液の流れが一方向となり、また、電極上に予め形成された親水性高分子層により電極面の濡れが向上し、気液の交換が円滑に行なわれることによるものと考えられる。

さらに、カバーやスペーサなど、空間部を構成する部材の表面を界面活性剤で予め処理して親水性とすることにより、さらに円滑な試料液の導入が可能であった。

一方、添加された試料液はCMCを溶解し粘調な液体となり、試料液中のグルコースは電極上に担持されたグルコースオキシダーゼの作用で酸素と反応して過酸化水素を生成する。そこで、試料液を導入して1分後に電極間に1Vの電圧を印加することにより、測定極をアノード方向へ分極した。上記のアノード方向への電圧印加により、生成し過酸化水素の酸化電流が得られた。この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。

上記構成になるセンサの応答特性の一例として、

電圧印加 5 秒後の電流値とグルコース濃度との関係を第 4 図 A に示すが、良好な応答特性が得られた。

また、上記と同一仕様のグルコースセンサス 30 ケについて同じ試料液で試験したところ、変動係数は約 5 % と良好であった。

さらに、第 10 図に示す従来例の構成で試作したグルコースセンサとともに、湿度が 30 % と 80 % の条件下で、蒸発による影響についてそれぞれ 10 ケのセンサを用いて比較検討したところ、本発明になるグルコースセンサにおいては 5 分放置後においてもその影響は無視し得るものであったが、従来構成のものについては低湿度の方が 2 分後において約 3 % 高値を示した。

以上のように、本発明になる上記構成のグルコースセンサは、微量の試料液をすみやかに反応層領域へ吸入し、周囲の湿度等による影響を受けることなく、簡易、迅速かつ高精度にグルコース濃度を測定することができる。

(実施例 2)

CMC-GOD層を形成するまでは実施例1と全く同様に作製した後、さらに以下に示す方法でCMC-GOD-電子受容体層からなる反応層を形成した。

電子受容体としてはフェリシアン化カリウムを用い、平均粒系が約 $10\mu\text{m}$ 以下のものをトルエン中にレシチンを用いて分散し、得られた分散液をCMC-GOD層上へ展開した。この後、トルエンを蒸発させて、CMC-GOD-電子受容体層からなる反応層を電極系上に形成し、さらに実施例1と同様にしてスペーサ、カバーとともに一体化し、第2図に示す構造のグルコースセンサとした。

次に、前記同様にしてセンサ先端部分よりグルコース標準液を導入し、約1分後に両極間に600mVの電圧を印加することにより、酵素反応で生成したフェロシアン化カリウムを測定極で酸化し、このときの電圧印加5秒後の電流値を測定した。この結果、第4図Bに示す様にグルコース濃度と応答電流値の間に極めて良好な直線関係が得

られた。また、30ヶのセンサを用いて変動係数を調べたところ、グルコース標準液について2.6%、全血試料について3%と極めて良好な値を示した。また、蒸発の影響について実施例1と同様に試験したところ、前記同様の効果が得られた。

上記実施例において、導入口及び排出口を設けるにあたっては、第1図～第3図に示した配置以外に、第5図の分解斜視図および第6図の外観図に示すように、カバー9と基板1にそれぞれ穴を設けて導入口10と排出口11としてもよい。

また、第7図の分解斜視図に示すように、スペーサを7と7'の2つに分けることにより、空間部8と導入口10及び排出口11とすることもできる。

(実施例3)

実施例1と同様の方法により、第8図に示す電極部を構成した。すなわち、基板上に銀リード3、21、22、23とこれらに対応する対極5及び3ヶの測定極41、42、43を形成することにより、対極を共有する3組の電極系を構成した。

次に、各々の測定極近傍に実施例 2 と同様にして C M C - G O D - フェリシアン化カリウム層からなる反応層を形成した。

次に、スペーサおよびカバーを実施例 1 と同様に接着して一体化した。ここで、スペーサはその一部が「くし状」に切りとられており、この切りとられた部分が空間部 8 を形成している。この空間部はそれぞれの電極系上に分割されているが、全体としては連続しており、共通の空間部となっている。また、端部は導入口 1 0 となる。

これらの各電極系上に分割されて構成された空間部に対応して、カバー 9 には 3 ケの穴をあけ排出口 1 1、1 2、1 3 を設けている。導入口 1 0 を試料液に接触させると、3 ケの排出口より空間部内の空気が排出されながら試料液は空間部内へ速やかに導入される。

実施例 2 と同様にして、グルコース標準液に対する応答を 3 ケの電極系について測定し、その平均値を求めて 1 ケのセンサの応答値とした。これを、3 0 ケの同一仕様の上記グルコースセンサに

ついて試験したところ、変動係数は2%と良好な値を示した。

ディスポーザブルタイプのセンサにおいては、各センサ毎の電極面積などの差異をはじめとする誤差要因をいかに小さくするかが信頼性向上において重要である。これらセンサ間の差異は同一試料液に対する測定値の差を生ずる原因となっている。しかしながら、上記のように、同一センサに複数の電極系を設け、その応答値の平均値を得ることにより、より高精度な測定を迅速に行なうことができる。

第8図には3組の電極を有する例について示したが、これに限定されることはなく、さらに多数の電極系を設置することが可能である。また、空間部の形状については、電極系の形状や配置も同様であるが、図示したものに限定されるものではない。

(実施例4)

第9図に複数の電極系を有する構成の変形例を示す。すでに述べた実施例1と同様の方法で、基

板上に銀リード 2 1、2 2、3 とこれらに対応する測定極 4 1、4 2 と共通の対極 5 からなる 2 組の電極系を構成した。次に、実施例 2 と同様にし、CMC-GOD-フェリシアン化カリウム層からなる反応層を各々の電極系上へ形成した後、スペーサ 7 とカバー 9 を接着した。ここでスペーサは独立した空間部 8 1、8 2 となる 2 ケの穴を有しており、これに対応する排出口 1 1、1 2 と共通の導入口 1 0 がカバーに設けてある。

上記構成のグルコースセンサについて、実施例 3 に述べたと同様に、グルコース標準液に対する 2 組の電極系の応答値を平均して 1 ケのセンサの測定値とし、30 ケの同一仕様のセンサについて試験したところ、変動係数は 2.2 % と良好であった。

この様に、第 9 図に示すセンサにおいては、より高精度な測定ができるほか、独立した空間部を有しているので、1 ケのセンサで異なる試料液、あるいは時間や温度等の異なる条件下での測定に供することもできる。

上記においては、カバーに1ヶの穴を設けて共通の導入口としたが、この構成に限定されることはない。複数組の電極系と複数の独立した空間部からなる測定系を構成することが重要な点であり、2ヶの穴を設けて、それぞれの空間部に対する導入口を構成してもよい。

以上に述べた実施例1～4においては、空間部につながる導入口と排出口については、その好適な位置関係の一例を実施例として図示したものであり、排出口を導入口として、また導入口を排出口として用いてもよい。さらに、各々の図に示したスペーサおよびカバーは独立した部材からなっているが、成形などにより1ヶの一体部材とすれば量産上有利である。

また上記、空間部を構成する部材表面を新水性とすることにより、試料液の導入がより円滑となるが、このためには親水性の材料を用いるか、あるいは実施例に述べたように、予め界面活性剤で処理し親水性とすればよい。

一方、基板とカバーの間隔は、スペーサの厚み

あるいはこれに相当する部分の寸法を変えることによって調節することができるが、大きすぎると空間部を満たすに要する試料液が多くなり、また毛管現象による液導入にも支障をきたす。また、間隔が小さすぎると、電極間の抵抗の増大や電流分布の乱れを生ずる。以上の点から、間隔としては0.05～1.0 mmが適当であり、さらに好ましくは0.1～0.5 mmである。

実施例においては、親水性高分子としてCMCを用いたが、その役割は、すでに述べたように試料液の円滑な導入の他に、試料液に含まれる吸着性物質が電極へ吸着し応答に影響するのを防止することにある。

親水性高分子としてはCMCの他にゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの吸水性あるいは水溶性の親水性高分子を適当な濃度の溶液にしたものを塗布、乾燥するこ

とにより、必要な膜厚の親水性高分子層を電極上に形成することができる。

なお、以上の実施例においては電極部分が測定極と対極の2電極からなる電極系について述べたが、電極系を参照極を加えた3電極から構成することにより、さらに精度を向上することができる。

また、電極材料としては、実施例に示したカーボンは安定で安価な材料として適しているが、これに制限されることはなく、他の貴金属材料や酸化物材料を用いてもよい。

また、電子受容体としては、実施例に示したフェリシアン化カリウムは安定性や反応速度の点で優れたものであるが、これ以外に、例えばキノン系化合物やフェロセン系化合物などのレドックス化合物を用いることもできる。

さらに、酸化還元酵素としては上記実施例に示したグルコースオキシダーゼに限定されることはなく、アルコールオキシダーゼやコレステロールオキシダーゼなど種々の酵素を用いることができる。

発明の効果

以上のように本発明によれば、電極系と反応層を有する基板上に反応層を含む空間部を形成し、この空間部につながる試料液の導入口と気体の排出口を設けることにより、ごく僅かの被検液量で極めて容易に、かつ精度よく基質濃度を測定することのできる安価なディスポーザブルタイプのバイオセンサを提供することができる。

4、図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第2図はその外観図、第3図はその断面模式図、第4図はバイオセンサの応答特性図、第5図は別の実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第6図はその外観図、第7図、第8図および第9図はさらに別の実施例であるバイオセンサの分解斜視図、第10図は従来のバイオセンサの分解斜視図である。

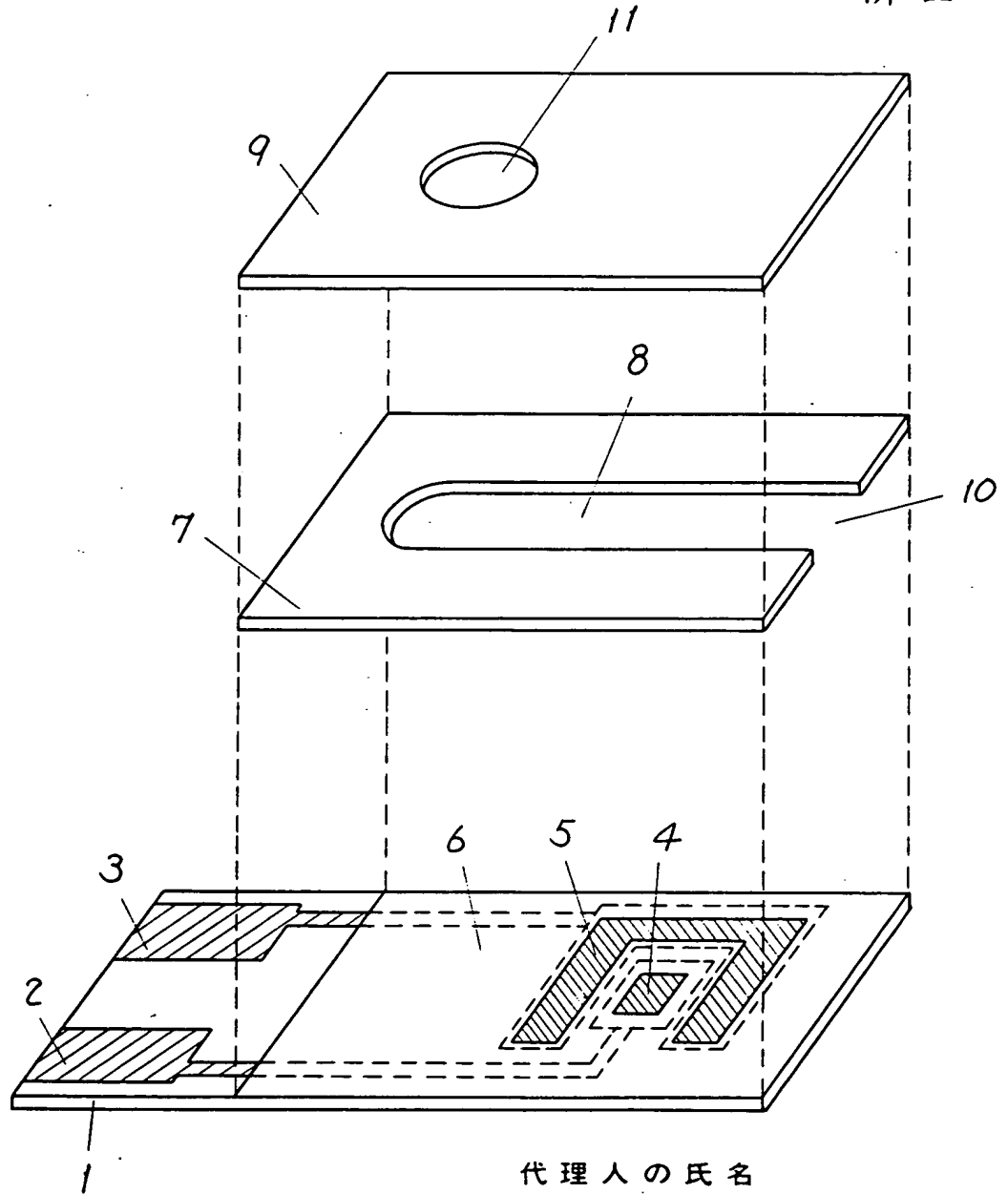
1, 5 1 ……基板、2, 3, 3', 2 1, 2 2, 2 3, 5 2, 5 3, 5 4 ……リード、4, 4 1, 4 2, 4 3, 5 3' ……測定極、5, 5', 5 2

’ …… 対極、 6, 5 5 …… 絶縁層、 7, 7 ’ ……
スペーサ、 8, 8 1, 8 2 …… 空間部、 9, 5 8
…… カバー、 1 0 …… 導入口、 1 1, 1 2, 1 3
…… 排出口、 1 4 …… 反応層、 5 4 ’ …… 参照極、
5 6 …… 保持枠、 5 7 …… 多孔体、 。

代理人の氏名 弁理士 中尾敏男 ほか 1 名

- 1 --- 基板
- 2, 3 --- リード
- 4 --- 測定極
- 5 --- 対極
- 6 --- 絶縁層
- 7 --- スペース
- 8 --- 空間部
- 9 --- カバー
- 10 --- 導入口
- 11 --- 排出口

第 1 図

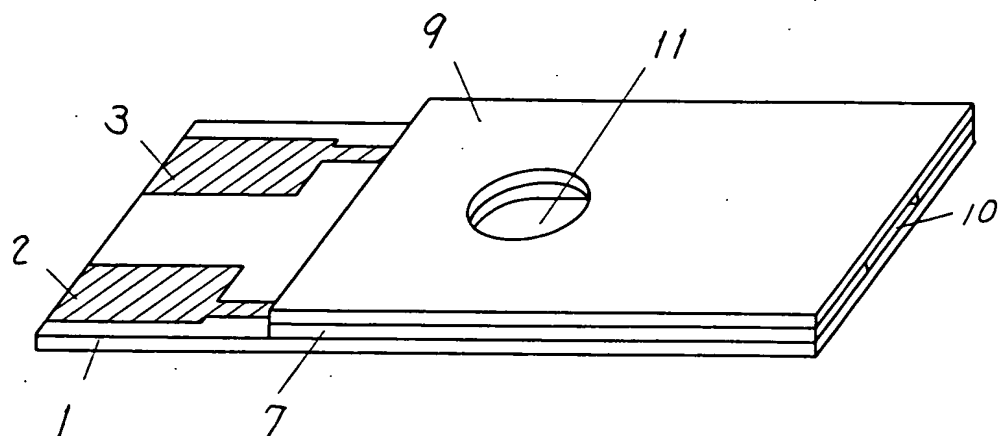


代理人の氏名

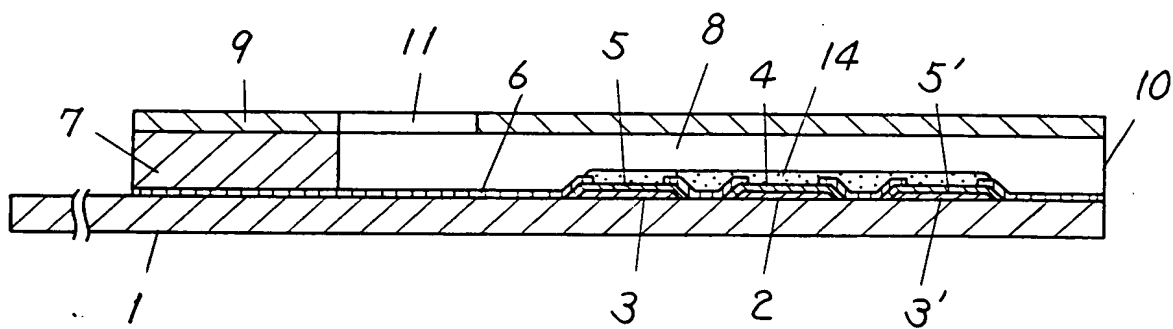
弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名

第 2 図



第 3 図

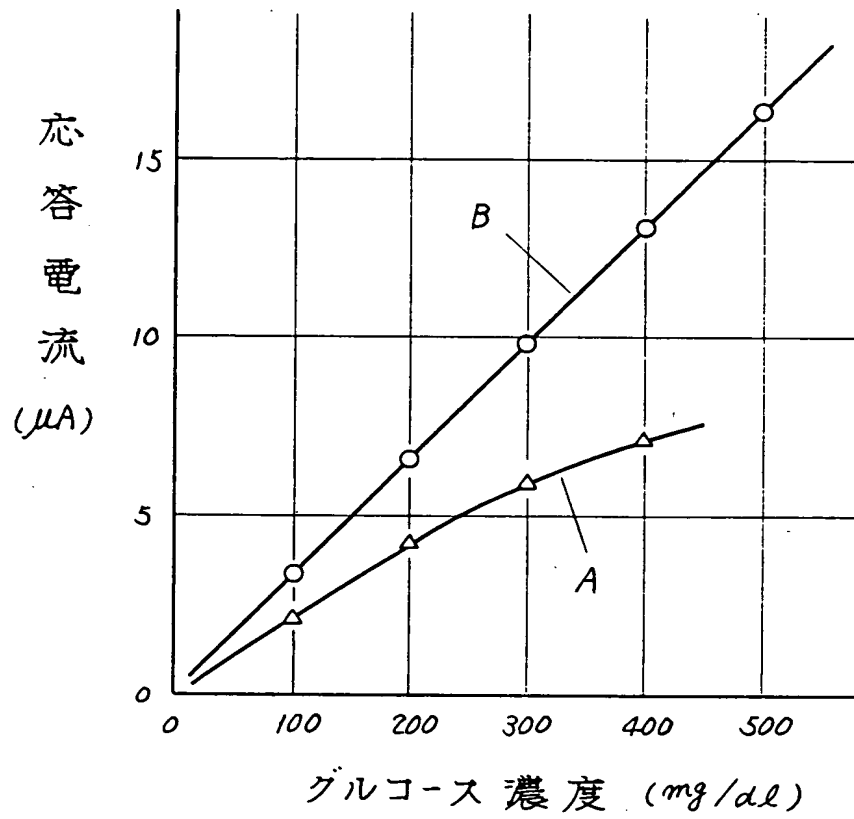


代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名

第 4 図

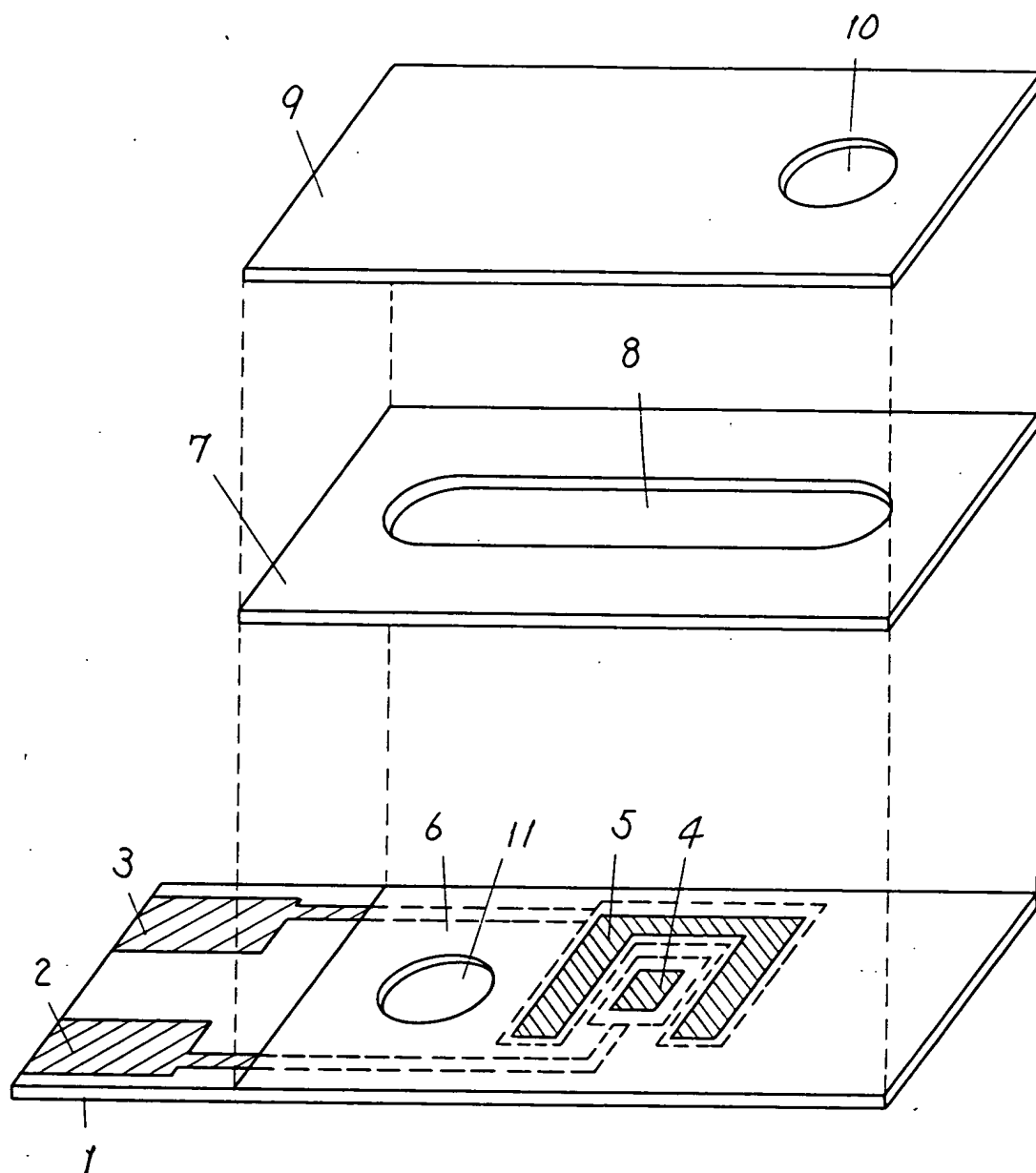


代理人の氏名

井理士 中 尾 敏 男

ほか1名

第 5 図

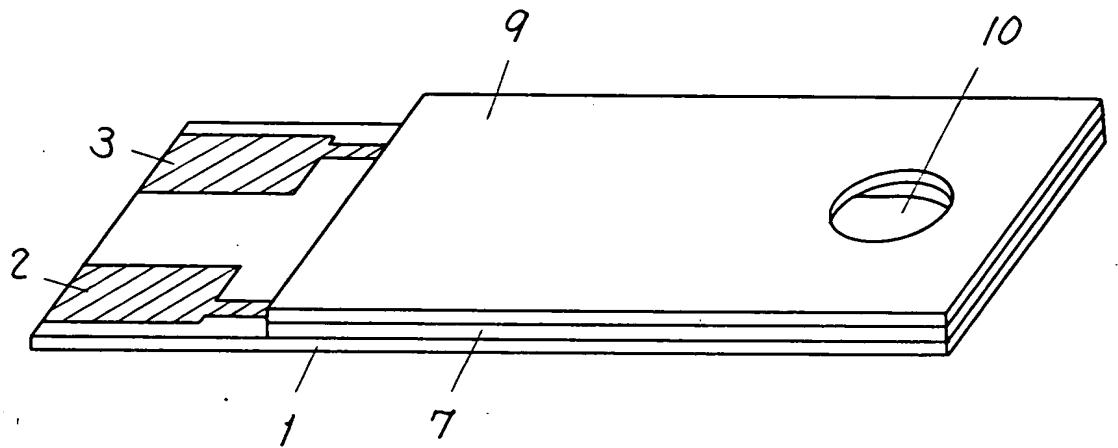


代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名

第 6 図

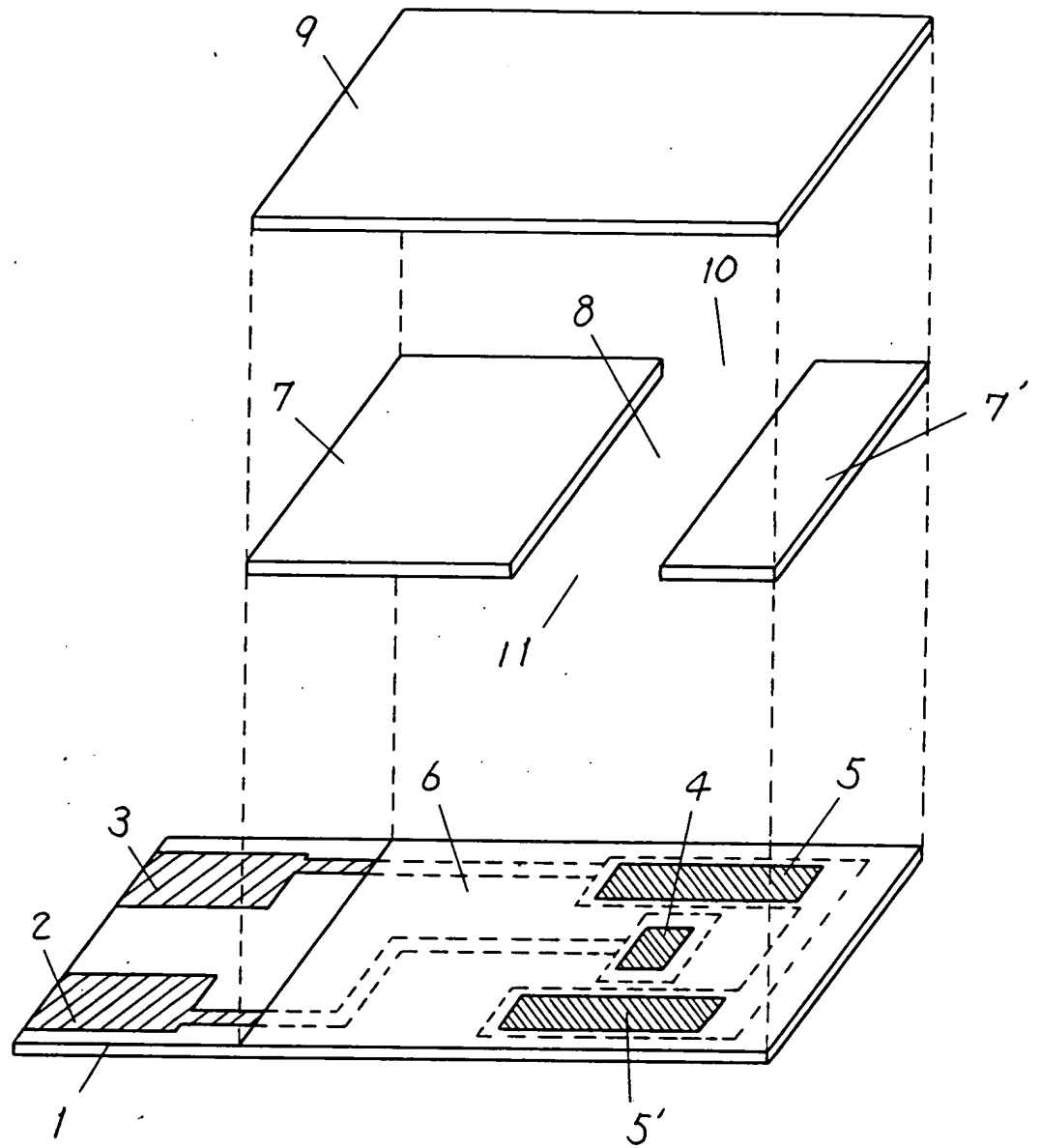


代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名

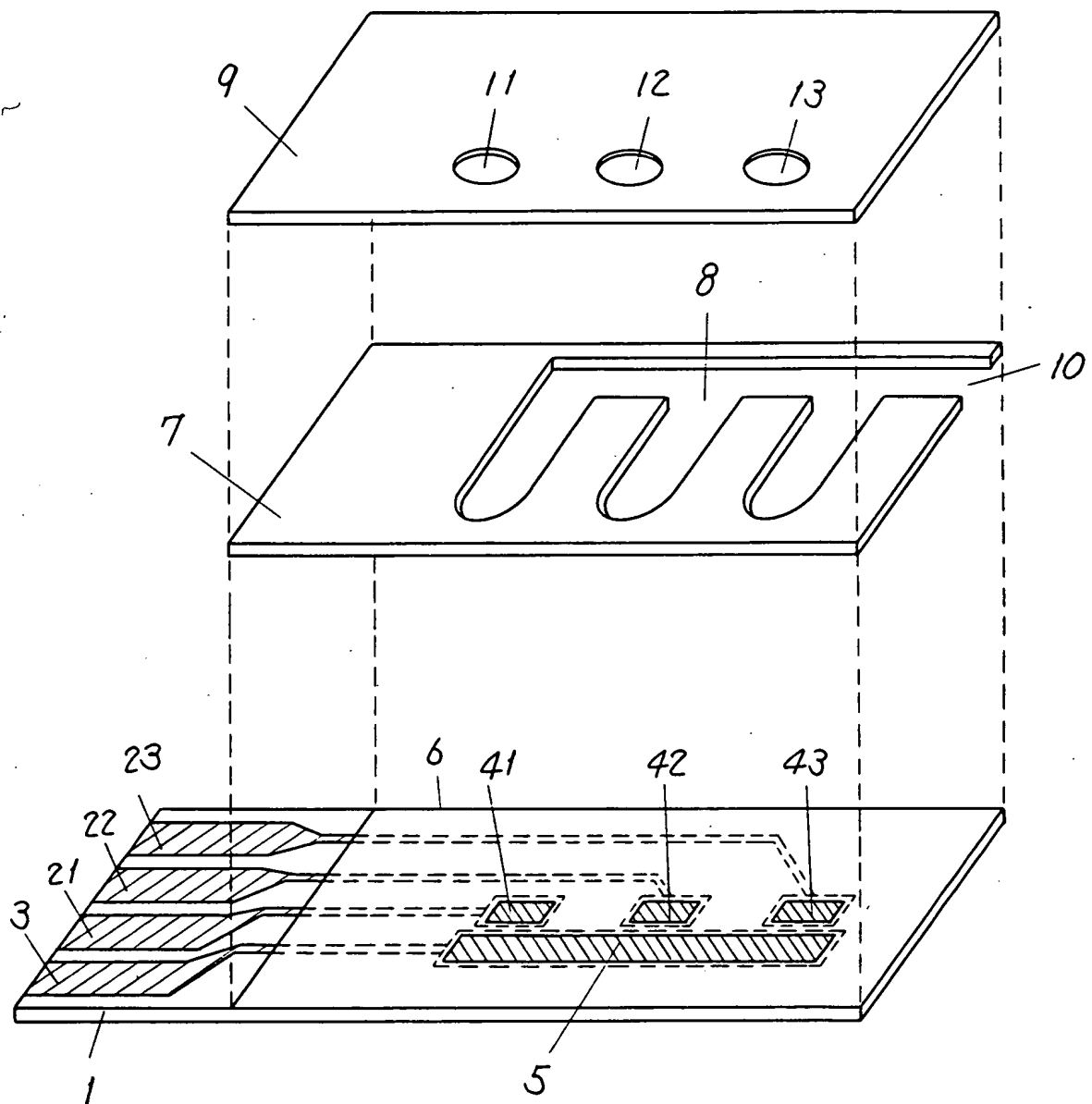
第 7 図



代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名

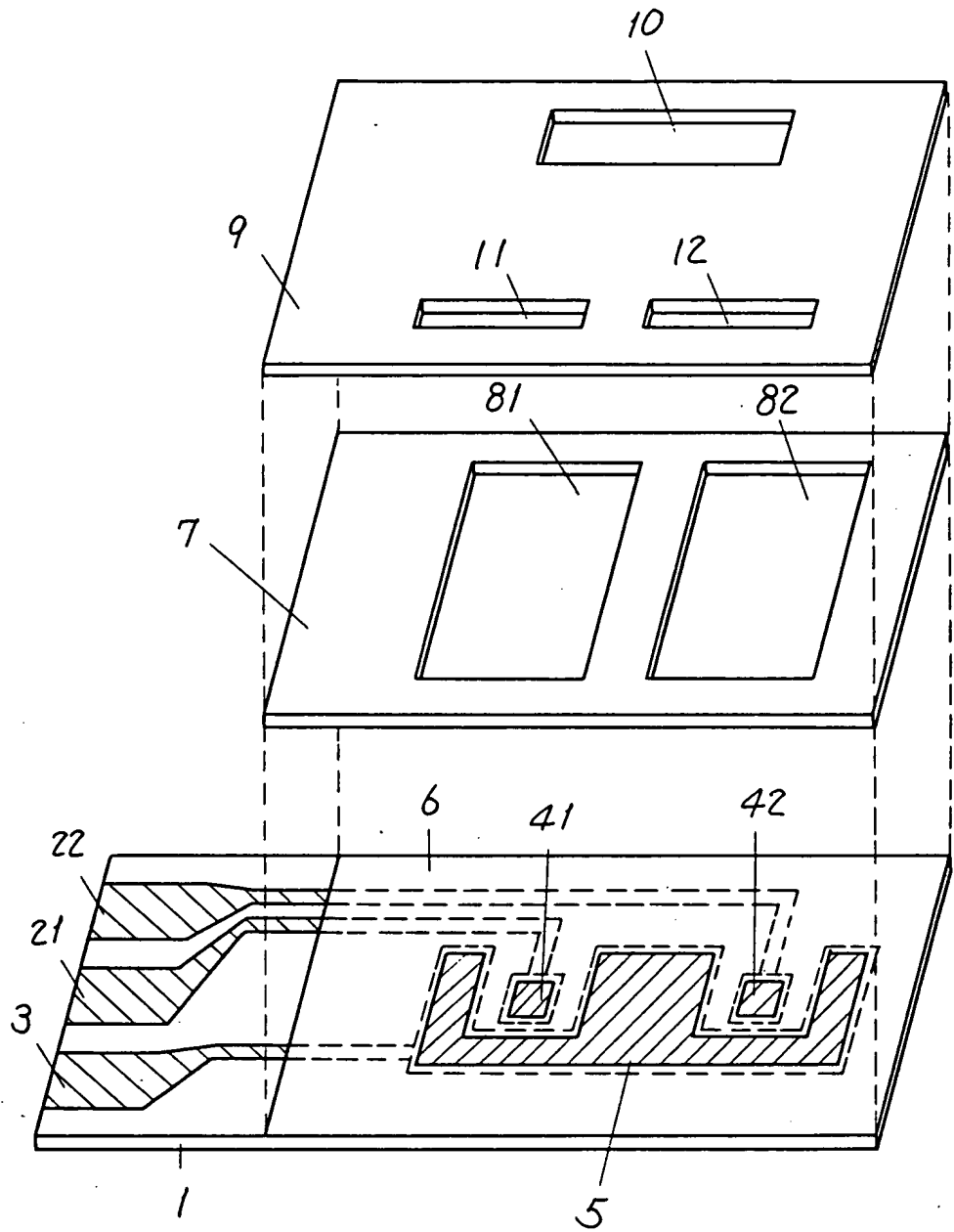


代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名

第 9 図

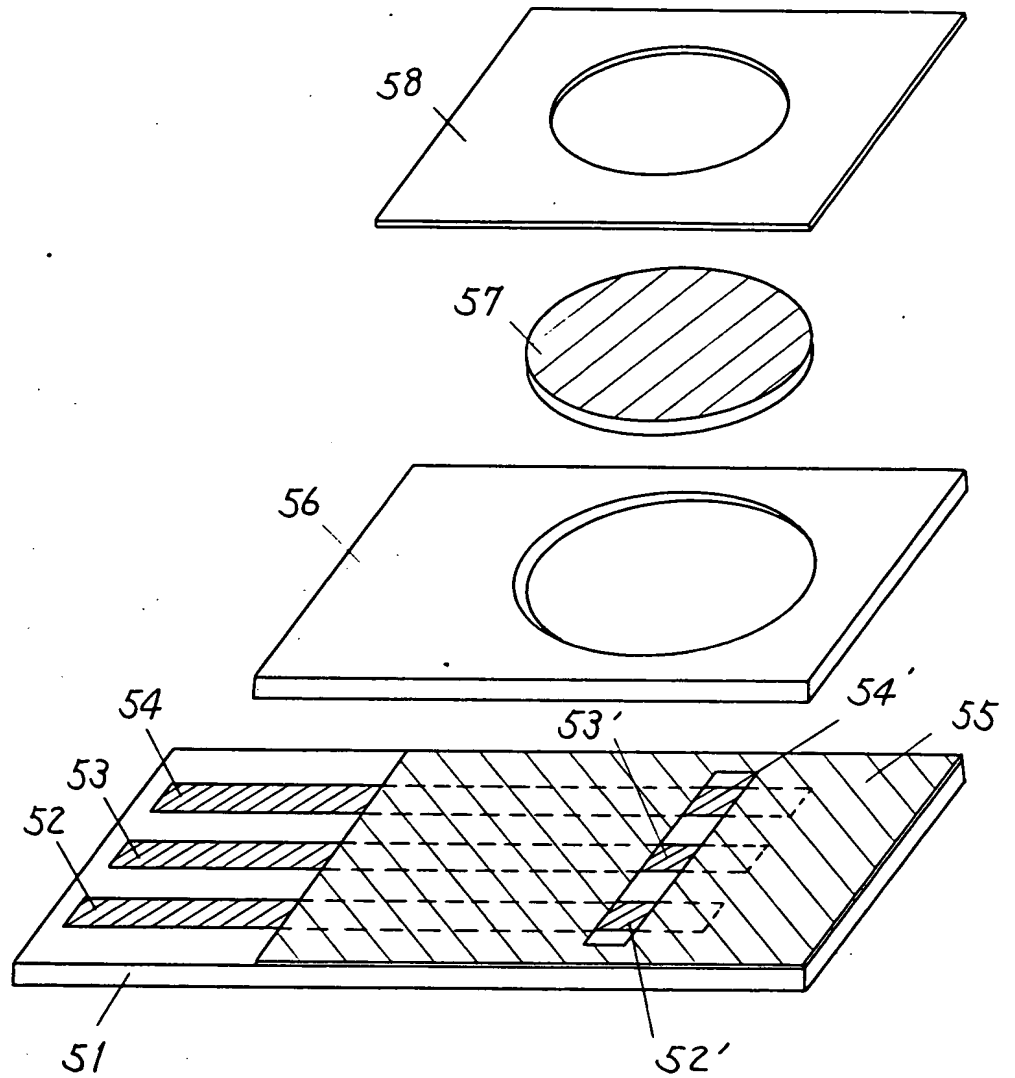


代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名

第 1 0 図



代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか 1 名